

OMAGGIO

SUL DOSAMENTO

Im R

DELL'ANTITOSSINA DIFTERICA

PEL

Dott. N. PANE

Prof. incaricato di Batteriologia.

(Estratto dalla *Nuova Rivista Clinico-terapeutica*, Anno V, N.° 3, 1902).

NAPOLI

STABILIMENTO TIPOGRAFICO CAV. NICOLA JOVENE E C.°

Piazza Trinità Maggiore, 13

1902

SUL DOSAMENTO

DELL'ANTITOSSINA DIFTERICA

PEL

Dott. N. PANE
Prof. incaricato di Batteriologia.

(Estratto dalla *Nuova Rivista Clinico-terapeutica*, Anno V, N.° 3, 1902).

NAPOLI
STABILIMENTO TIPOGRAFICO CAV. NICOLA JOVENE E C.^o
Piazza Trinità Maggiore, 13
1902



Il metodo seguito in Italia per dosare l'antitossina del siero antidifterico è quello che si adopera nel reale istituto di terapia sperimentale in Frankfurt diretto dall'Ehrlich, dove, come è noto, si fa il controllo ufficiale dei sieri terapeutici pel regno di Prussia. È un metodo convenzionale in cui chiamasi unità immunizzante (U. I.) l'azione di una quantità di antitossina (contenuta in un dato volume di siero specifico), di neutralizzare cento dosi mortali per la cavia di gr. 250 di tossina difterica. Della tossina e antitossina si fa un miscuglio in vitro, per poi dimostrarne la neutralizzazione avvenuta coll'inoculazione di questo miscuglio nel tessuto sottocutaneo di cavie del peso anzidetto (1). A tale scopo non si inoculano sotto la cute di una cavia (questa in ogni caso dev'essere nelle migliori condizioni di salute per avere un esatto risultato) tutte le 100 dosi mortali di tossina colla rispettiva antitossina neutralizzante, ma soltanto la decima parte. Dall'effetto ottenuto si risale col calcolo alla quantità di U. I. contenuta in un cc. di siero antitossico. Come è noto, la concentrazione di antitossina in un dato volume di siero non è in rapporto col grado d'immunità raggiunto dall'animale. I cavalli, che sono gli animali da cui s'ottiene un siero terapeutico che può avere la massima concentrazione di antitossina, danno di ciò la dimostrazione la più evidente. Tra essi infatti se ne riscontrano di quelli, che, malgrado sopportino bene alte dosi di tossina, danno al massimo un siero di appena 100 U. I. per cc., ed altri che danno facilmente del siero di 300 e più U. I. per cc.

Attualmente un siero terapeutico non deve contenere meno di 100

(1) Nella neutralizzazione non si tratta effettivamente di un'azione chimica in vitro, ma di una pura azione biologica nell'organismo animale (vedi Pane, *Riforma medica* 1890).

U. I. per cc., quindi un siero di questa forza può servire come tipo, a cui riportare per confronto tutti gli altri sieri di forza maggiore. Ora, nella determinazione di U. I. dell'anzidetto siero se ne diluisce tre volte 1 c.c. successivamente in 10 c.c. di acqua, talchè 1 cc. della terza diluizione contiene siero c.c. 0;001 e mescolato a 10 dosi mortali, per la cavia di gr. 250 di tossina difterica ne deve controbilanciare l'azione tossica nella prova d'inoculazione sottocutanea in questo animale. *È utile qui notare che 1 c.c. di tal siero di 100 U. I. è virtualmente capace di neutralizzare diecimila dosi mortali di tossina.*

Supponiamo ora di avere a determinare con precisione il numero di U. I. di un siero, dove un esame preliminare ha dimostrato che ne contiene un numero che sta tra 100 e 200 per c.c., allora è evidente che due vie vi sono per tale determinazione: o si trova la quantità di siero capace di neutralizzare la stessa quantità di tossina, che viene neutralizzata da un c.c. di siero di 100 U. I. facendo una serie di supposizioni, che poi hanno bisogno di esser provate sperimentalmente; ovvero si diluisce un c.c. di siero in modo che 1 c.c. della diluizione contenga esattamente la quantità di siero che neutralizza 10 dosi mortali di tossina.

Nel primo caso bisogna risolvere una serie di equazioni, ad es. nove, cioè: $1:100::110:x$, $1:100::120:x$, $1:100::130:x$, $1:100::140:x$, $1:100::150:x$, $1:100::160:x$, $1:100::170:x$, $1:100::180:x$, $1:100::190:x$. L'equivalente di x nelle diverse operazioni, cioè 0,909.., 0,833..; 0,769..; 0,714..; 0,666..; 0,625..; 0,588..; 0,555..; 0,526.., rappresenta le rispettive frazioni di 1 c. c. di siero. Ciascuna di queste frazioni, misurata approssimativamente con pipetta graduata al centesimo di c.c., si diluisce tre volte successivamente in 10 c.c. di acqua, e 1 c.c. della terza diluizione mescolata a 10 dosi mortali di tossina s'inocula nel tessuto sottocutaneo della cavia di gr. 250. Se ad esempio la cavia che riceve un c.c. della terza diluizione della frazione 0,666, cioè siero c.c. 0,000666, non muore, mentre soccombe quella che riceve l'eguale volume della terza diluizione della frazione 0,625, il numero delle U. I. sta tra 150 e 160. Ricercando poi il numero virtuale di dosi mortali di tossina che 1 c.c. di questo siero può neutralizzare, si trova che questo sta tra 15,000 e 16,000.

Che io sappia, in questa foggia viene dosato il siero nei diversi istituti sieroterapici che seguono il sistema di dosamento dell'Ehrlich.

Avendo dovuto da alcuni anni occuparmi anch'io di tale dosamento nell'Istituto sieroterapico napoletano da me diretto, trovai non

poca difficoltà nella misurazione esatta delle frazioni di c.c., per la quale era inoltre indispensabile una perdita di tempo considerevole; pensai quindi di escogitare una modificazione nel misurare il siero, cioè, come dissi, prendendone un c.c. per volta. Ecco come procedo. Dopo di essermi, assicurato con un dosamento preliminare per 100 200 e 300 U. I. secondo la capacità del cavallo di produrre siero più o meno concentrato, procedo al dosamento completo.

Supponiamo, come sopra, che il numero di U. I. stia tra 100 e 200; allora diluisco 1 c.c. di siero in 9 c.c. d'acqua (preferisco all'acqua distillata la soluzione fisiologica di cloruro sodico, dove il siero non forma precipitati); da questa prima diluizione prendo 1 c.c. che diluisco in 9 c.c. d'acqua e un cc. di questa seconda diluizione lo diluisco in 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18. In tal modo c.c. 0,01 di siero viene diluito 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 volte. Ciascun c.c. di queste ultime diluizioni mescolate a 10 dosi mortali di tossina (1) (contenute in 1 c.c. di liquido) s'inocula nel tessuto sottocutaneo di una cavia di gr. 250. Se, ad esempio, muore la cavia che riceve la diluizione di siero c.c. $0,01|16 = 0,000625$, mentre resta in vita quella che riceve siero c.c. $0,01|15 = 0,000666$, allora il numero delle U. I. sta tra 150 e 160. Il numero virtuale delle dosi mortali di tossina neutralizzabili da 1 c.c. di questo siero sta tra 15,000 e 16,000.

Come si vede, in questo modo il processo del dosamento del siero, pur restando identico al precedente, vien reso molto più semplice, comodo e rapido; talchè con una mezz'ora di tempo, avendo a disposizione una serie sufficiente di pipette graduate, di siringhe e di tubi di vetro chiusi a smeriglio per contenere le diverse diluizioni, si espleta l'operazione agevolmente.

In conclusione, si può dire che un c.c. di siero antidifterico terapeutico contiene tante diecine di U. I. quanti sono i c.c. d'acqua, per cui dividendo c.c. 0,01 di esso si ha la neutralizzazione completa di dieci dosi mortali di tossina per la cavia di gr. 250.

(1) Il brodocoltura di bacilli ditterici, che io adopero pel dosamento della tossina, viene conservato in boccetta da 10 c. c. alla temp. di circa 10° e all'oscuro. Il brodocoltura in queste boccette viene adoperato non prima di due mesi dopo la preparazione, ed è così ricco di tossina, anche dopo 2 mesi, che un trentesimo di c. c. uccide la cavia di gr. 250 in circa 48 ore. Tale tossicità si conserva lungo tempo con leggiera graduale diminuzione.
